



PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 15/54, 9/10, 1/21, C07K 16/40, C12Q 1/48, A61K 38/45, C12Q 1/68, G01N 33/573	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/05253 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 13. Februar 1997 (13.02.97)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE96/01401 (22) Internationales Anmeldedatum: 26. Juli 1996 (26.07.96) (30) Prioritätsdaten: 195 27 552.7 27. Juli 1995 (27.07.95) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS [DE/DE]; Im Neuenheimer Feld 280, D-69120 Heidelberg (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): POUSTKA, Annemarie [AT/DE]; Werderstrasse 36, D-69120 Heidelberg (DE). COY, Johannes [DE/DE]; In den scharzen Gärten 1, D- 63762 Großostheim (DE). (74) Anwalt: HUBER, Bernard; Truderinger Strasse 246, D-81825 München (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>
(54) Title: TRANSKETOLASE-RELATED PROTEIN (54) Bezeichnung: TRANSKETOLASE-VERWANDTES PROTEIN (57) Abstract The invention pertains to a transketolase-related protein, a DNA which codes for such a protein and a process for manufacturing such a protein. The invention also pertains to the use of the DNA and protein and antibodies to the protein. (57) Zusammenfassung Die vorliegende Erfindung betrifft ein Transketolase-verwandtes Protein, eine ein solches kodierende DNA und ein Verfahren zur Herstellung eines solchen. Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung der DNA und des Proteins sowie gegen das Protein gerichtete Antikörper.		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LX	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauritanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

Transketolase-verwandtes Protein

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Transketolase-verwandtes Protein, eine ein solches kodierende DNA und ein Verfahren zur Herstellung eines solchen. Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung der DNA und des Proteins sowie gegen das Protein gerichtete Antikörper.

Transketolase ist ein Thiamin-abhängiges Enzym, das den Pentosephosphatzyklus mit der Glykolyse verbindet. Der Pentosephosphatzyklus stellt Zuckerphosphate und NADPH bereit. Transketolase führt überschüssige Zuckerphosphate in die Glykolyse ein, wodurch die Bereitstellung von NADPH unter verschiedenen metabolischen Bedingungen gewährleistet ist. NADPH ist für das Aufrechterhalten von Glutathion im Gehirn wesentlich.

Eine Defizienz von Thiamin ist mit neurologischen Erkrankungen, wie Beriberi und Wernicke-Korsakoff Syndrom, assoziiert. Beriberi äußert sich in akuter Herzinsuffizienz, während sich das Wernicke-Korsakoff Syndrom in akuter Enzephalopathie, gefolgt von chronischer Schädigung des Kurzzeitgedächtnisses zeigt.

Untersuchungen weisen darauf hin, daß eine Thiamin-Defizienz für vorstehende Erkrankungen nicht ursächlich ist. Auch liegt bei Patienten dieser Erkrankungen, z.B. bei Patienten des Wernicke-Korsakoff-Syndroms, keine mutierte Transketolase vor. Die Ursache vorstehender Erkrankungen ist somit bisher nicht bekannt.

- 2 -

Der vorliegenden Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, ein Mittel bereitzustellen, mit dem neurologische Erkrankungen, die mit einer Thiamin-Defizienz assoziiert sind, insbesondere Beriberi und Wernicke-Korsakoff Syndrom, in ihrer Ursache untersucht und gegebenenfalls therapiert werden können.

Erfindungsgemäß wird dies durch die Gegenstände in den Patentansprüchen erreicht.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein Transketolase-verwandtes Protein, wobei das Protein zumindest die Aminosäuresequenz von Fig. 1 oder eine hiervon durch eine oder mehrere Aminosäuren unterschiedliche Aminosäuresequenz umfaßt.

Die vorliegende Erfindung beruht auf der Erkenntnis des Anmelders, daß in Tieren, besonders Säugetieren, ganz besonders dem Menschen, ein Protein existiert, das Homologien zu einer Transketolase, gegebenenfalls eine Transketolase-Aktivität aufweist, sich aber von einer Transketolase auf dem DNA-Level durch Hybridisierung unter üblichen Bedingungen unterscheidet. Ein solches Protein weist zumindest die Aminosäuresequenz von Fig. 1 oder eines hiervon auf. Ferner durch eine oder mehrere Aminosäuren unterschiedliche Aminosäuresequenz liegt das Protein in verschiedenen Geweben, z.B. Gehirn und Herz, in unterschiedlicher Form vor.

In der vorliegenden Erfindung wird vorstehendes Protein mit "Transketolase-verwandtes Protein" (TVP) bezeichnet.

In bevorzugter Ausführungsform weist ein (TVP) die Aminosäuresequenz von Fig. 2 auf. Ein solches (TVP) findet sich insbesondere im Gehirn von Tieren, besonders Säugetieren, ganz besonders dem Menschen.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform weist ein (TVP) die Aminosäuresequenz von Fig. 3 auf. Ein solches (TVP) findet sich insbesondere im Herzen

- 3 -

von Tieren, besonders Säugetieren, ganz besonders dem Menschen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine für ein (TVP) kodierende Nukleinsäure. Dies kann eine RNA oder eine DNA sein. Letztere kann z.B. eine genomische DNA oder eine cDNA sein. Bevorzugt ist eine DNA, die folgendes umfaßt:

- (a) die DNA von Fig. 1 oder eine hiervon durch ein oder mehrere Basenpaare unterschiedliche DNA,
- (b) eine mit der DNA von (a) hybridisierende DNA, oder
- (c) eine mit der DNA von (a) oder (b) über den degenerierten genetischen Code verwandte DNA.

Der Ausdruck "hybridisierende DNA" weist auf eine DNA hin, die unter üblichen Bedingungen, insbesondere bei 20°C unter dem Schmelzpunkt der DNA, mit einer DNA von (a) hybridisiert.

Besonders bevorzugt ist die DNA von Fig. 2 und Fig. 3. Die DNA von Fig. 2 kodiert für ein (TVP), das insbesondere im Gehirn von Tieren, besonders Säugetieren, ganz besonders dem Menschen, vorliegt. Die DNA von Fig. 3 kodiert für ein (TVP), das insbesondere im Herzen von Tieren, besonders Säugetieren, ganz besonders dem Menschen, vorliegt. Die DNA von Fig. 2 wurde bei der DSM (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) als JFC 317 unter DSM 9994 am 23. Mai 1995 hinterlegt.

Nachstehend wird eine erfindungsgemäße DNA in Form einer cDNA beschrieben. Diese steht beispielhaft für jede unter die vorliegende Erfindung fallende DNA.

Zur Herstellung einer erfindungsgemäßen cDNA ist es günstig, von einer Cosmid-Bibliothek, z.B. q1Z (vgl. Dietrich, A. et al., Nucleic Acids Res. 19, (1991), 2567-2572) auszugehen, von der Klone die Region Xq28 des menschlichen Genoms umfassen. Solche Klone werden auf einer Filtermembran fixiert und mit

- 4 -

markierten, aus mRNA von Schweinegeweben, z.B. Gehirn, Muskel, Leber, Herz, durch reverse Transkription erhaltenen cDNA-Pools hybridisiert (vgl. Coy, J.F. et al., Mammalian Genome 5, (1994) 131-137). Diejenigen Klone, die mit den cDNA-Pools ein Hybridisierungssignal aufweisen, werden zum Screening einer menschlichen cDNA-Bibliothek, z.B. von fötalem Gehirn-, Herzgewebe, verwendet. Hierfür eignet sich besonders die cDNA-Bibliothek λ -Zap, Stratagene, Kat.-Nr. 936206. Es wird eine erfindungsgemäße cDNA erhalten.

Eine erfindungsgemäße cDNA kann in einem Vektor bzw. Expressionsvektor vorliegen. Beispiele solcher sind dem Fachmann bekannt. Im Falle eines Expressionsvektors für *E. coli* sind dies z.B. pGEMEX, pUC-Derivate, pGEX-2T, pET3b und pQE-8, wobei letzterer bevorzugt ist. Für die Expression in Hefe sind z.B. pY100 und Ycpad1 zu nennen, während für die Expression in tierischen Zellen z.B. pKCR, pEFBOS, cDM8 und pCEV4, anzugeben sind. Für die Expression in Insektenzellen eignet sich besonders der Baculovirus-Expressionsvektor pAcSGHisNT-A.

Der Fachmann kennt geeignete Zellen, um eine, erfindungsgemäße, in einem Expressionsvektor vorliegende cDNA zu exprimieren. Beispiele solcher Zellen umfassen die *E.coli*-Stämme HB101, DH1, x1776, JM101, JM 109, BL21 und SG 13009, wobei letzterer bevorzugt ist, den Hefe-Stamm *Saccharomyces cerevisiae* und die tierischen Zellen L, 3T3, FM3A, CHO, COS, Vero und HeLa sowie die Insektenzellen sf9.

Der Fachmann weiß, in welcher Weise eine erfindungsgemäße cDNA in einen Expressionsvektor inseriert werden muß. Ihm ist auch bekannt, daß diese DNA in Verbindung mit einer für ein anderes Protein bzw. Peptid kodierenden DNA inseriert werden kann, so daß die erfindungsgemäße cDNA in Form eines Fusionsproteins exprimiert werden kann.

Des weiteren kennt der Fachmann Bedingungen, transformierte bzw. transfizierte Zellen zu kultivieren. Auch sind ihm Verfahren bekannt, das durch die

- 5 -

erfindungsgemäße cDNA exprimierte Protein zu isolieren und zu reinigen. Ein solches Protein, das auch ein Fusionsprotein sein kann, ist somit ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein gegen ein vorstehendes Protein bzw. Fusionsprotein gerichteter Antikörper. Ein solcher Antikörper kann durch übliche Verfahren hergestellt werden. Er kann polyklonal bzw. monoklonal sein. Zu seiner Herstellung ist es günstig, Tiere, insbesondere Kaninchen oder Hühner für einen polyklonalen und Mäuse für einen monoklonalen Antikörper, mit einem vorstehenden (Fusions)protein oder Fragmenten davon zu immunisieren. Weitere "Booster" der Tiere können mit dem gleichen (Fusions)protein oder Fragmenten davon erfolgen. Der polyklonale Antikörper kann dann aus dem Serum bzw. Eigelb der Tiere erhalten werden. Für den monoklonalen Antikörper werden Milzzellen der Tiere mit Myelomzellen fusioniert.

Die vorliegende Erfindung ermöglicht es, neurologische Erkrankungen, die mit einer Thiamin-Defizienz assoziiert sind, wie Beriberi und Wernicke-Korsakoff Syndrom, in ihrer Ursache zu untersuchen. Mit einem erfindungsgemäßen Antikörper kann (TVP) in Körperflüssigkeiten von Personen nachgewiesen werden. Es kann eine Beziehung von (TVP) zur Entstehung und Ausbildung vorstehender Erkrankungen hergestellt werden. Ferner kann mit einem erfindungsgemäßen (TVP) ein gegen dieses Protein gerichteter Autoantikörper nachgewiesen werden. Beide Nachweise können durch übliche Verfahren, insbesondere einen Western Blot, einen ELISA, eine Immunpräzipitation oder durch Immunfluoreszenz, erfolgen. Desweiteren kann mit einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure, insbesondere einer DNA und hiervon abgeleiteten Primern, die Expression des für (TVP) kodierenden Gens nachgewiesen werden. Dieser Nachweis kann in üblicher Weise, insbesondere in einem Southern Blot, erfolgen.

Darüberhinaus eignet sich die vorliegende Erfindung, Maßnahmen für und gegen das Vorliegen von (TVP) in Personen zu ergreifen. Mit einem erfindungsgemäßen Antikörper kann (TVP) an Personen inhibiert werden. Andererseits kann mit

- 6 -

einem erfindungsgemäßen (TVP), insbesondere nach Kopplung an ein vom Körper nicht als fremd angesehenes Protein, z.B. Transferrin oder BSA, die Menge von (TVP) in Personen erhöht werden. Entsprechendes kann auch mit einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure, insbesondere einer DNA, erreicht werden, die unter die Kontrolle eines in bestimmten Geweben, z.B. Gehirn, Herz, induzierbaren Promotors gestellt wird und nach ihrer Expression zur Bereitstellung von (TVP) in diesen Geweben führt. Darüberhinaus kann eine erfindungsgemäße Nukleinsäure, insbesondere eine DNA, auch zur Inhibierung von (TVP) genutzt werden. Hierzu wird die Nukleinsäure, z.B. als Basis für die Erstellung von Anti-Sinn-Oligonukleotiden zur Expressions-Inhibierung des für (TVP) kodierenden Gens verwendet.

Die vorliegende Erfindung stellt somit einen großen Beitrag zur diagnostischen und therapeutischen Erfassung von neurologischen Erkrankungen, die mit einer Thiamin-Defizienz assoziiert sind, insbesondere Beriberi und Wernicke-Korsakoff Syndrom, dar.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen:

- Fig. 1 zeigt die Basensequenz und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz eines erfindungsgemäßen (TVP),
- Fig. 2 zeigt die Basensequenz und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz eines erfindungsgemäßen Gehirn-spezifischen (TVP) (Pfeile geben die Lage von (TVP) von Fig. 1 an), und
- Fig. 3 zeigt die Basensequenz und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz eines erfindungsgemäßen Herz-spezifischen (TVP) (Pfeile geben die Lage von (TVP) von Fig. 1 an).

Die vorliegende Erfindung wird durch die nachstehenden Beispiele erläutert.

- 7 -

Beispiel 1: Herstellung und Reinigung eines erfindungsgemäßen (TVP)

Zur Herstellung eines erfindungsgemäßen (TVP) wurde die DNA von Fig. 2 bzw. 3 als Template verwendet. Es wurde ein PCR-Verfahren durchgeführt. Bezüglich der DNA von Fig. 2 wurde als Primer-Paar verwendet: 5'-CAGAGATCTATGAG-GTACAAGCAGTCAG-3' und 5'-GGGAAGCTTTTAGTTCAGCAACATGC-3'. Bezüglich der DNA von Fig. 3 wurde als Primer-Paar verwendet: 5'-CAGAGATCTATGTGGCGTATCCATGC-3' und 5'-GGGAAGCTTTTAGTTCAG-CAACATGC-3'. Der PCR-Ansatz bzw. die PCR-Bedingungen waren jeweils wie folgt:

PCR-Ansatz

Template DNA (Fig. 1)	: 1 μ l = 1 ng
Pfu-Polymerase 10x-Puffer	: 10 μ l = 1 x
DMSO	: 10 μ l = 10 %
dNTP's	: 1 μ L = je 200 μ M
Oligonukleotide, je 1,5 μ l	: 3 μ l = je 150 ng
H ₂ O-bidest	: ad 99 μ l

PCR-Bedingungen

- 92°C - 5 min
- Zugabe von 1 μ l Pfu-Polymerase (Stratagene) = 2,5 Einheiten
- Zugabe von Paraffin

PCR

92°C	1 min	
58°C	1 min	1 Zyklus
72°C	10 min	
92°C	1 min	
58°C	1 min	39 Zyklen
72°C	2 min	
72°C	10 min	1 Zyklus

- 8 -

Die amplifizierte DNA wurde jeweils mit Bgl II und Hind III gespalten und in den mit Bgl II- und Hind III gespaltenen Expressionsvektors pQE-8 (Diagen) inseriert. Es wurde das Expressionsplasmid pQ/TVP-G (pQ/TVP-H) erhalten. Ein solches kodiert für ein Fusionsprotein aus 6 Histidin-Resten (N-Terminuspartner) und dem erfindungsgemäßen (TVP) von Fig. 2 (Fig.3) (C-Terminuspartner). pQ/TVP-G (pQ/TVP-H) wurde zur Transformation von E.coli SG 13009(vgl. Gottesman, S. et al., J. Bacteriol. 148, (1981), 265-273) verwendet. Die Bakterien wurden in einem LB-Medium mit 100µg/ml Ampicillin und 25µg/ml Kanamycin kultiviert und 4 h mit 60µM Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Durch Zugabe von 6 M Guanidinhydrochlorid wurde eine Lyse der Bakterien erreicht, anschließend wurde mit dem Lysat eine Chromatographie (Ni-NTA-Resin) in Gegenwart von 8 M Harnstoff entsprechend der Angaben des Herstellers (Diagen) des Chromatographie-Materials durchgeführt. Das gebundene Fusionsprotein wurde in einem Puffer mit pH 3,5 eluiert. Nach seiner Neutralisierung wurde das Fusionsprotein einer 18 % SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterworfen und mit Coomassie-Blau angefärbt (vgl. Thomas, J.O. und Kornberg, R.D., J.Mol.Biol. 149 (1975), 709-733).

Es zeigte sich, daß ein erfindungsgemäßes (Fusions)protein in hochreiner Form hergestellt werden kann.

Beispiel 2: Herstellung und Nachweis eines erfindungsgemäßen Antikörpers

Ein erfindungsgemäßes Fusionsprotein von Beispiel 1 wurde einer 18 % SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterzogen. Nach Anfärbung des Gels mit 4 M Natriumacetat wurde eine ca. 59 (16,5) kD Bande aus dem Gel herausgeschnitten und in Phosphat gepufferter Kochsalzlösung inkubiert. Gel-Stücke wurden sedimentiert, bevor die Proteinkonzentration des Überstandes durch eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, der eine Coomassie-Blau-Färbung folgte, bestimmt wurde. Mit dem Gel-gereinigten Fusionsprotein wurden Tiere wie folgt immunisiert:

Immunisierungsprotokoll für polyklonale Antikörper im Kaninchen

Pro Immunisierung wurden 35 µg Gel-gereinigtes Fusionsprotein in 0,7 ml PBS und 0,7 ml komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt.

- Tag 0: 1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans)
- Tag 14: 2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans; icFA)
- Tag 28: 3. Immunisierung (icFA)
- Tag 56: 4. Immunisierung (icFA)
- Tag 80: Ausbluten

Das Serum des Kaninchens wurde im Immunoblot getestet. Hierzu wurde ein erfindungsgemäßes Fusionsprotein von Beispiel 1 einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterzogen und auf ein Nitrocellulosefilter übertragen (vgl. Khyse-Andersen, J., J. Biochem. Biophys. Meth. 10, (1984), 203-209). Die Western Blot-Analyse wurde wie in Bock, C.-T. et al., Virus Genes 8, (1994), 215-229, beschrieben, durchgeführt. Hierzu wurde das Nitrocellulosefilter eine Stunde bei 37°C mit einem ersten Antikörper inkubiert. Dieser Antikörper war das Serum des Kaninchens (1:10000 in PBS). Nach mehreren Waschschritten mit PBS wurde das Nitrocellulosefilter mit einem zweiten Antikörper inkubiert. Dieser Antikörper war ein mit alkalischer Phosphatase gekoppelter monoklonaler Ziege Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (Dianova) (1:5000) in PBS. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C folgten mehrere Waschschrritte mit PBS und anschließend die alkalische Phosphatase-Nachweisreaktion mit Entwicklerlösung (36 µM 5' Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat, 400 µM Nitroblau-tetrazolium, 100 mM Tris-HCl, pH 9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) bei Raumtemperatur, bis Banden sichtbar waren.

Es zeigte sich, daß erfindungsgemäße, polyklonale Antikörper hergestellt werden können.

- 10 -

Immunisierungsprotokoll für polyklonale Antikörper im Huhn

Pro Immunisierung wurden 40 µg Gel-gereinigtes Fusionsprotein in 0,8 ml PBS und 0,8 ml komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt.

- Tag 0: 1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans)
Tag 28: 2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans; icFA)
Tag 50: 3. Immunisierung (icFA)

Aus Eigelb wurden Antikörper extrahiert und im Western Blot getestet. Es wurden erfindungsgemäße, polyklonale Antikörper nachgewiesen.

Immunisierungsprotokoll für monoklonale Antikörper der Maus

Pro Immunisierung wurden 12 µg Gel-gereinigtes Fusionsprotein in 0,25 ml PBS und 0,25 ml komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt; bei der 4. Immunisierung war das Fusionsprotein in 0,5 ml (ohne Adjuvans) gelöst.

- Tag 0: 1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans)
Tag 28: 2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans; icFA)
Tag 56: 3. Immunisierung (icFA)
Tag 84: 4. Immunisierung (PBS)
Tag 87: Fusion

Überstände von Hybridomen wurden im Western Blot getestet. Erfindungsgemäße, monoklonale Antikörper wurden nachgewiesen.

Patentansprüche

1. Transketolase-verwandtes Protein, wobei das Protein zumindest die Aminosäuresequenz von Fig. 1 oder eine hiervon durch eine oder mehrere Aminosäuren unterschiedliche Aminosäuresequenz umfaßt.
2. Protein nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es die Aminosäuresequenz von Fig. 2 umfaßt.
3. Protein nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es die Aminosäuresequenz von Fig. 3 umfaßt.
4. DNA, kodierend für das Protein nach Anspruch 1.
5. DNA nach Anspruch 4, wobei die DNA umfaßt:
 - (a) die DNA von Fig. 1 oder eine hiervon durch ein oder mehrere Basenpaare unterschiedliche DNA,
 - (b) eine mit der DNA von (a) hybridisierende DNA oder
 - (c) eine mit der DNA von (a) oder (b) über den degenerierten genetischen Code verwandte DNA.
6. DNA nach Anspruch 4 oder 5, nämlich die DNA von Fig. 2.
7. DNA nach Anspruch 4 oder 5, nämlich die DNA von Fig. 3.
8. Expressionsplasmid, umfassend die DNA nach einem der Ansprüche 4 bis 7.
9. Transformante, enthaltend das Expressionsplasmid nach Anspruch 8.
10. Verfahren zur Herstellung des Proteins nach einem der Ansprüche 1 bis 3,

- 12 -

umfassend die Kultivierung der Transformante nach Anspruch 9 unter geeigneten Bedingungen.

11. Antikörper, gerichtet gegen das Protein nach einem der Ansprüche 1 bis 3.
12. Verwendung des Proteins nach einem der Ansprüche 1 bis 3 als Reagens zur Diagnose und/oder Therapie.
13. Verwendung der DNA nach einem der Ansprüche 4 bis 7 als Reagens zur Diagnose und/oder Therapie.
14. Verwendung des Antikörpers nach Anspruch 11 als Reagens zur Diagnose und/oder Therapie.

1 GTCCCTCCGCCACATGTCAGTGCACAGGTCACA 11
V L E H C V S D K V T
34 GATATGGAGCTGGATTAATGCTGTATGATGAGCTTTCGAAACAGATATTTTATCCGTGTCATCCACCTGTTTACCAT 44
V I G A G I T V Y E A L A A A D E L S K Q D I F I R V I D L F T I
133 AATCTCTGGATGTCGCCACCATGCTCTCCAGTGCATAGCCACAGAGCCCGGATCATTTACACTGAGGATCCGCAAGTGGCATCCGGGNA 44
K P L D V A T I V S A K A T E G R I I T V E D H Y P Q G I G E 77
232 GCTGTCTCCGACGCTCTCCATGAGTCCCTGATTCATTCGCTGCACTGTCGGAGTCCGCCAGATGGGAGTCCGAGGAATTCCTGGAT 77
A V C A A V S M D P D I Q V H S L A V S C V P Q S G K S E L L D 110
331 ATGATGGAAATTAATGCCAGACATATCATAGTGGCCCTCAATGCAATGCTTGTGCTGCACTAATAAATAGCTGTAGCCCTGCTGTTTGGCCCTCTTTACCCCTG 129
M Y G I S A R H I I V A V K C M L N
430 TGTATGTTTGTCTCCAAACCATCATTTTAAATCTCFACCTGTCACATTTTGTTCCTTAAGCAAGCCAGCTAACACCTTTCATTCATCCCTTACCTCG 129
529 AATTCAGCTTAATCTTACCTTTTAAAGTCTCACTGCATATGCCAGTACCCCTCTTAATTTTGTGATCATTTAAGGGAGCTTACACACATTTTAAAGTGA
620 AATAATAGGTAAACAAACACACCTCTGATAGTAAATTTCTGATAGCACTATAGATAGTGTAGAGGTAATCAATTTCTCCGAAGTGTTCCTTCCTCGT
727 GATCAACTGGTAGAGGTAAATAGTTTTCATATGATTTTTCATATGATTTTCATATGATTAAGCAAGAAATGCGATTCGAGTATAGATTTCCAGTAGCTAGCTTCCACAGC
826 ACCATAACACCATGACGCCCTACTGCTGTGTTCCACCTTGGGATTTCTGTGTGCTGCTGCCATCCACCTGCAGCTGCCCTGGAATTC

Fig. 1

[illegible]

3/3

1 GGCGTATTCCTGCTCCAGGACACCTGGAGCAGTGTAAATTCCTATACAAAGTCTCCGCCACTGTGTCACTGTCACTGACACAAAGGTCCACA
 ↓
 84 GTATATGGAGCTGGAAATTAAGTATGAGCCCTTAGCAGCTGCTGATGAGCTTTCGAAACAGAGATATTTATATCCCTGTTCATGACCTGTACCACTT
 V I G A G I T Y H A A A A A D E L E K Q D I F I R V I D L F T I
 183 AAACCTCTGGATGTGCGCCACCTGCTCCAGTGCNAAAGCCACACAGCGCCGAGTCACTACGCTGAGAGATCACTACCCGCAAGTGGCATCCGGGAAA
 K P L D V A T I V S A K A T E G R I I T V E D H Y P Q C G I G E
 282 GCTCTGCGCAGCACTCTCCATGATCCGACATCTACGCTTCACTGCTGGAGTGTGGAGTGCCTCCAGTGGAGAGTCCGAGGAATATGCTGGAT
 A V C A A V S M D P D I Q V H E L A V E G V P Q S G K S E E L L D
 381 ATGTATGAAATTAAGTCCGACGACATCATATGCGCGGTAAATGCTGTTCGAAAGCTAAATATGCTGTATGACCTTGTCTTTGGCCCTCTTTTACCCCTG
 N Y G I S A R H I I V A V K C M L L M
 480 TGTATGTGTCTCCNAAACCACTCAATTAATCTCACTGCTCACTATTTGTGTTCTTAAGCAAGCAGCACTAACACCTTCATTCCTGATGTTCCG
 579 ABAATTCAGCTAACACTTACCTTTAAACTGTCACTGCATATGCAAGTACCCCTCTAATTTTGGATCATTAAGGAGCTTTACACAACTTTTAAAGTGA
 678 AAAAAATGGTAAACAAACACACCTGATAGTAGTGTCTGATTAAGCTATAGATAGAGTATAGCTAACTAACTTCGGAAGTGTGTTCCCTTGGT
 777 CAATAACTGGTAGAGTAAATAGTTTTTTTCAATGATATTTTCTCTCAAGTAAAGAAATATGTGATTTGAAGTATAGATTTCCAGTAACTGCTACTTTCCACACAGC
 776 AGCNTAACAACCTAGACGCTACTGCTGTTCCTCCACCTTGGGANTCTGTGTGTCGAGCCATCCCACTCCTGCTGCTCGGAATTC

Fig. 3